

**RAPPORT DE MISSION AU GABON
HEVEGAB-MITZIC**

du 24 juin au 29 juillet 1991

Meriem LOUANCHI



Institut de Recherches sur le Caoutchouc

*Département du Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)*

42, rue Scheffer 75116 Paris (France) - Tél. (1) 47 04 32 15

Télécopie : (1) 47 27 33 66

Télex : 640975 Infranc Paris

SOMMAIRE

OBJECTIFS DE LA MISSION	3
I. Constitution d'une collection	3
II. Prélèvements d'échantillons sur arbre en plantation	3
III. Etude du pouvoir pathogène	4
CONCLUSIONS	6

ANNEXES

Annexe 1 : Essai MZTP15

Annexe 2 : Essai MZOP10

La mission effectuée au Gabon, durant le mois de juillet, s'inscrit dans le cadre d'une étude sur *Rigidoporus lignosus* (Fomes), responsable de la pourriture blanche des racines d'*Hevea brasiliensis*, et plus particulièrement dans la recherche de nouvelles techniques de détection, telles que les méthodes sérologiques.

Cette mission a permis tout d'abord de constituer une collection d'isolats, prélevés dans les plantations de Mitzic, Bitam, Koumameyong Kango et Lambaréné.

Le séjour dans la plantation industrielle d'HEVEGAB-Mitzic au laboratoire IRCA-CATH, avait pour objectifs de mettre en place deux essais. Le premier était de prélever des échantillons de bois et de latex sur des arbres en plantation pour la mise au point de tests immunoenzymatiques. Le second était d'optimiser une méthode d'infections artificielles sur jeunes plantules et initier ainsi une étude du pouvoir pathogène de différents isolats.

Avant de décrire les différents essais, je tiens à remercier les personnes d'HEVEGAB-Mitzic et de l'IRCA-GABON, pour les facilités et les moyens mis à ma disposition qui ont permis de mener à bien les objectifs fixés de cette mission.

OBJECTIFS DE LA MISSION

I. CONSTITUTION D'UNE COLLECTION

1. OBJECTIFS

Le sujet de recherche entamé depuis décembre 1989 et concernant le modèle d'étude *Rigidoporus lignosus*/hévée, comprend une partie importante qui est l'évaluation de la variabilité de la population pathogène par des méthodes biochimiques et moléculaires.

Les premiers résultats permettent de distinguer à l'intérieur de l'espèce, deux sous-populations liées à l'origine géographique des isolats. Une des limites de cette étude provient du fait que le nombre des isolats testés provenant du Gabon était réduit (2 au total).

2. REALISATION

Des racines infectées ont été prélevées dans les plantations de Mitzic, Bitam, Kango, Koumameyong et Lambaréné.

Les isolements ont été effectués au laboratoire IRCA-CATH de Mitzic.

Après différents contrôles, cinq isolats ont été retenus et inclus dans la collection.

3. PERSPECTIVES

Ces isolats seront étudiés par leurs profils isoenzymatiques d'une part et par les gènes codant pour leur ARN ribosomiques d'autre part.

II. PRELEVEMENTS D'ECHANTILLONS SUR ARBRES EN PLANTATION

1. OBJECTIFS

Les prélèvements d'échantillons sur arbres en plantation serviront à tester l'efficacité des sérums dirigés contre différentes protéines du champignon. Ces sérums ont été obtenus au laboratoire de Versailles et leurs qualités *in vitro* ont été étudiées.

2. REALISATION

Des prélèvements de bois et de latex sont effectués sur des plantings 84 (parcelle 1/7) et des plantings 88 (parcelle 5/6). Les échantillons sont conservés à -20°C, jusqu'à l'analyse sérologique.

Deux types de sérums seront testés. L'un est dirigé contre les protéines mycéliennes du champignon, dans le cas où il constituerait le marqueur de la maladie. Le second est dirigé contre des protéines excrétées en milieu liquide dans le cas où le marqueur à détecter migrerait dans les parties aériennes de l'arbre.

Les modes de prélèvement des différents échantillons et le principe des techniques immunoenzymatiques, sont détaillés en annexe 1.

3. PERSPECTIVES

Les résultats devraient permettre de mettre au point les tests immunoenzymatiques sur notre modèle d'étude et d'évaluer les possibilités de détection par cette méthode.

Ces tests permettraient la détection d'arbres réellement infectés. Associées aux méthodes actuellement proposées, la différenciation entre les stades d'infection et de contamination pourra alors être possible.

III. ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE

1. OBJECTIFS

Cet essai a pour but d'optimiser une méthode d'infection artificielle sur jeunes plantules par la comparaison de deux inoculums primaires: bûchettes et tronçons infectés.

En parallèle, une étude du pouvoir pathogène d'une population de *R. lignosus* représentée par des isolats d'origine différentes, est initiée dans le but de mesurer sa variabilité en comparant les niveaux d'agressivité des différents isolats.

2. REALISATION

Pour ce qui est de l'infection des plantules, une première étape consiste à la préparation de l'inoculum artificiel par l'ensemencement du champignon, en conditions stériles, sur des bûchettes d'hévéas ou sur des tronçons.

A partir de ces deux types d'inoculum artificiel, deux modes d'infection des plantules sont testés:

- 4 bûchettes infectées sont plaquées contre le pivot d'une plantule en sac de pépinière.

- Un tronçon infectés est placé au centre de 10 plantules disposées en couronne dans un bac de végétation.

Concernant l'étude de l'interaction hôte-parasite, les deux méthodes d'infection sont utilisées. 40 plantules, disposées en 4 blocs de 10 plantules, sont infectées par chacun des isolats.

Des observations visuelles seront faites toutes les semaines pendant toute la durée de l'essai et porteront sur:

- la vitesse de contamination dans le cas des tronçons
- l'observation de symptômes au niveau de la partie aérienne
- les mesures de croissance
- le dénombrement de folioles.
- l'analyse finale se fera après arrachage des plantules, par les tests sérologiques.

3. PERSPECTIVES

La réussite d'une des méthodes d'infections artificielles permettrait l'étude de la variabilité de la population pathogène en évaluant les niveaux d'agressivité des isolats.

CONCLUSIONS

Dans les différentes plantations visitées, les principaux problèmes phytosanitaires sont causés par les maladies de racines dues à *Rigidoporus lignosus* et *Armillaria*

Bien qu'il existe des fongicides efficaces, *R.lignosus* persiste et continue de causer des dommages importants aussi bien dans les plantations âgées que dans les jeunes plantations.

Les techniques de détection actuellement proposées permettent de localiser les foyers et la lutte chimique appliquée sur ces foyers limite ainsi l'incidence de la maladie.

Cependant, elles demeurent beaucoup trop contraignantes et difficilement interprétables à l'échelle d'une plantation, aucune différence ne pouvant être faite entre les taux d'infection et de contamination.

Le développement des méthodes sérologiques permettrait d'obtenir des outils de détection fiables et sensibles. Leur utilisation apporterait une nette amélioration dans la lutte contre la maladie.

Les possibilités de reproduire la maladie, par la maîtrise d'une méthode d'infection artificielle, de la contrôler et de la quantifier, grâce à des méthodes de détection telles que les tests immunoenzymatiques, constituent des outils complémentaires.

Ils ouvrent des voies d'études permettant non seulement une meilleure gestion de la lutte chimique, par une détection plus rigoureuse et par la recherche de fongicides efficaces, mais aussi une utilisation en lutte génétique par la recherche de résistances au niveau des clones existants et au niveau des nouveaux clones.

ANNEXES

ANNEXE 1

ESSAI MZTP15 PRELEVEMENTS EN PLANTATION DE MATERIEL VEGETAL A PARTIR D'HEVEAS INFECTES OU NON PAR *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*

1. CHOIX DES ARBRES

Des prélèvements de bois et de latex sont effectués dans les planting 84 (parcelle 1/7) et les planting 88 (Parcelle 5/6).

En ce qui concerne les planting 84, les prélèvements sont effectués sur un arbre malade, ses voisins directs et un voisin présumé sain. Au niveau de cette parcelle, cinq groupes d'arbres ont été choisis.

Pour ce qui est des planting 88, des prélèvements sont effectués sur des arbres malades et sur des arbres apparemment sains.

2. METHODES DE PRELEVEMENTS (figure 1)

Le bois est prélevé à l'aide d'une tarière permettant l'obtention de carottes de 5 mm de diamètre et 10 cm de longueur.

Ces prélèvements sont faits à la hauteur du panneau de saignée, au niveau du collet et du début du pivot et enfin, au niveau des racines importantes situées à 10 cm au dessous de la surface du sol.

Pour ce qui est du latex, 1 ml est prélevé aux niveaux des panneau de saignée, collet et début du pivot.

3. MISE AU POINT DES TESTS IMMUNOENZYMATIQUES (figure 2)

Le principe des tests immunoenzymatiques type test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est basé sur la réaction antigène-anticorps, après fixation de ces derniers sur un support. Le signal de cette réaction est amplifié grâce au couplage des anticorps à une enzyme dont la fixation est révélée par son substrat et entraîne une coloration mesurable au spectrophotomètre

figure 1 : METHODE DE PRELEVEMENT D'ECHANTILLON
SUR UN ARBRE EN PLANTATION

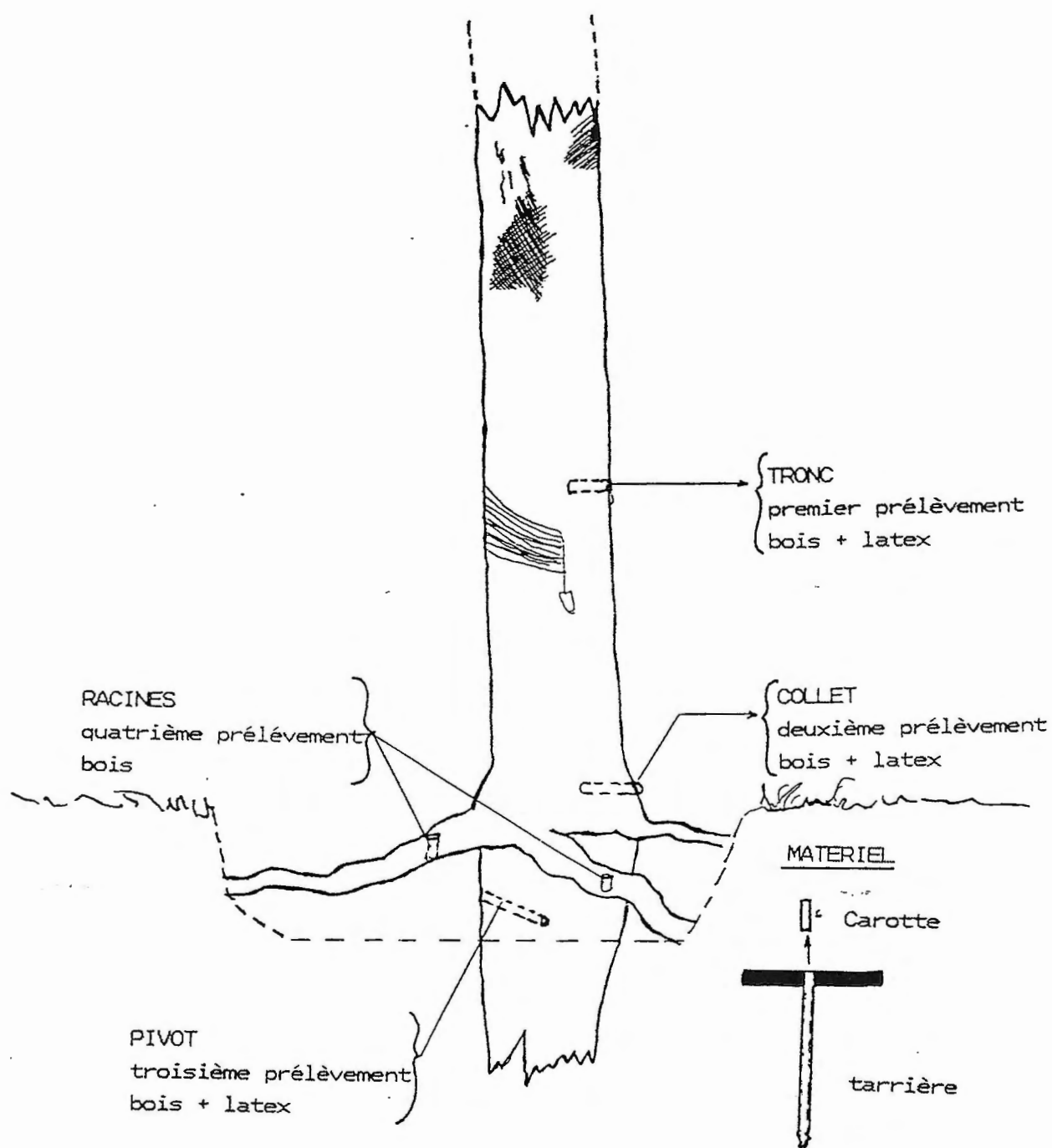
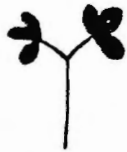


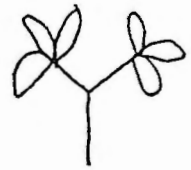
figure 2 : PRINCIPE DES TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES

Exemple: Méthode ACP-ELISA (Antigen Coated Plate)

ECHANTILLONS TESTES



malade



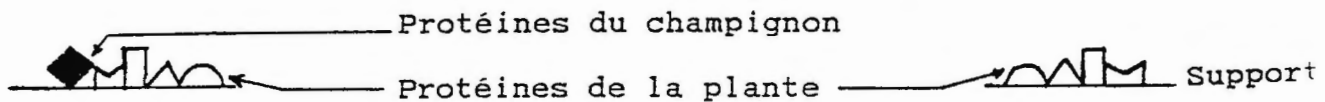
sain

BROYAGE DANS TAMPON D'EXTRACTION

EXTRAITS PRETS A ETRE ANALYSES EN ELISA

PREMIERE ETAPE: DEPOT DES EXTRAITS

fixation des proteines sur support
(polystyrène ou nitrocellulose)



DEUXIEME ETAPE: DEPOT DU SERUM DIRIGE CONTRE LE CHAMPIGNON

fixation des anticorps reconnaissant les sites
antigéniques spécifiques au champignon



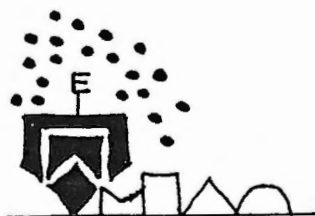
TROISIEME ETAPE: DEPOT D'UN CONJUGUE UNIVERSEL

fixation des anticorps couplés à
une enzyme etreconnaissant des
sérum produits à partir de sang de lapin

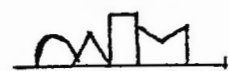


QUATRIEME ETAPE: DEPOT DU SUBSTRAT DE L'ENZYME

révélation de l'échantillon malade
par coloration de la réaction



coloration



. pas de coloration

ANNEXE 2

ESSAI MZOP10 INOCULATIONS ARTIFICIELLES DE JEUNES PLANTULES D'HEVEA BRASILIENSIS PAR RIGIDOPORUS LIGNOSUS

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. La plante hôte

Les expérimentations seront réalisées sur des jeunes plantules issues de graines d'*Hevea brasiliensis*. Si ces graines sont récoltées à la fin du mois d'août, la germination en bacs de sable humide commencera début septembre et durera 15 jours.

Deux types de repiquage, relatifs aux deux méthodes d'inoculation à tester, seront alors menés:
- le premier s'effectuera en sacs de pépinière, à raison d'une plantule par sac.
- Le second s'effectuera en bacs de végétation à raison de 10 plantules par bacs, plantées en couronnes (d = 40 cm). Les bacs seront fabriqués par l'atelier d'HEVEGAB-MITZIC (L = l = h = 50 cm; nombre de bacs = 32).

Pour tout l'essai, il faudrait prévoir la germination de 700 graines. Chacun des repiquages dénombre 320 plantules, ce qui fait un total de 640.

Le dispositif expérimental sera composé de 4 blocs. Chacun des blocs comprendra 10 plantules par isolat.

Les inoculations des plantules pourront alors se faire dès le mois de février.

1.2. Le champignon parasite

Six isolats prélevés à partir de pivots d'hévéa infectés et d'origine géographique différente, seront utilisés dans cet essai. Deux d'entre eux sont originaires du Gabon.

Leur conservation et leur culture sont faites à l'obscurité, à 28°C, sur milieu malt-gélosé 2%.

2. PREPARATION DE L'INOCULUM ARTIFICIEL

2.1. Inoculum bûchettes (figure 1)

Des fragments de bois frais de branches d'hévéa (L = 8 cm, d = 1,5 cm), sont disposés dans des fioles de Roux de 1 litre à raison de 60 bûchettes, ou de 500 ml à raison de 30 bûchettes et contenant 100 ml d'eau.

Les fioles ainsi préparées, sont autoclavées une heure à 120°C et sont ensuiteensemencées à l'aide de 8 implants (d = 8 mm) prélevés à partir d'une culture de chacun des isolats, âgée d'une quinzaine de jours.

Pour chaque isolat, 160 bûchettes sont préinoculées. 160 bûchettes non inoculées mais traitées de la même manière servent de premier témoin.

L'incubation est réalisée en mycothèque à 26°C et à l'obscurité jusqu'au moment de l'inoculation c'est à dire vers le mois de février.

2.2. Inoculum tronçon (figure 2)

Une pré-inoculation sur des tronçons d'hévéa frais (L = 30 cm; d = 10 cm), est effectuée par contact direct d'une culture de chaque isolat en milieu malt-gélosé âgée de 20 jours.

Chaque tronçon ainsi traité est entouré de coton cardé humide et placé dans un sac plastique noir stérile dont l'une des extrémités présente plusieurs petites ouvertures pour maintenir l'humidité du coton par apport d'eau.

Pour chaque isolat, 5 tronçons sont inoculés et des tronçons en contact direct avec le milieu malt-gélosé nonensemencé serviront de premier témoin.

L'incubation est réalisée en extérieur, sur un support en bois, jusqu'au moment de l'inoculation donc au courant du mois de février.

3. MODES D'INOCULATION

3.1. Plantules en sacs, inoculées par bûchettes (figure 1)

La contamination est effectuée en disposant 4 bûchettes parasitées par chacun des isolats, contre le pivot à 20 cm de la terre.

L'humidité doit être proche de la saturation et il faut donc arroser régulièrement les plantules.

Des plantules non inoculées servent de témoins.

3.2. Plantules en bacs, inoculées par tronçons (figure 2)

La contamination est effectuée en enfouissant chaque tronçon au centre du bac, à 20 cm de la surface de la terre. La distance le séparant de chaque plantule est de 10 à 20 cm.

Des bambous témoins sont placés entre le tronçon et les plantules afin de contrôler l'évolution du champignon avant la contamination.

Des plantules sans tronçon servent de témoins.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Des observations visuelles seront faites toutes les semaines pendant toute la durée de l'essai et porteront sur:

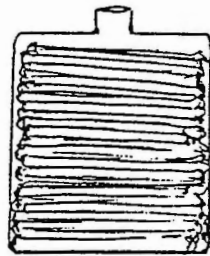
- la vitesse de contamination
- l'observation des symptômes au niveau de la partie aérienne
- le dénombrement des plantules mortes
- les mesures de croissance
- le dénombrement des folioles

Lorsque le taux de mortalités aura atteint 50%, tous isolats confondus, les plantules seront arrachées, lavées et conservées à - 20°C. L'analyse finale sera établie en sérologie par les techniques immunoenzymatiques.

figure 1 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL 1
Bûchettes / Plantules en sacs.

1. Infection des bûchettes

Bûchette : L = 8 cm d = 1.5 cm

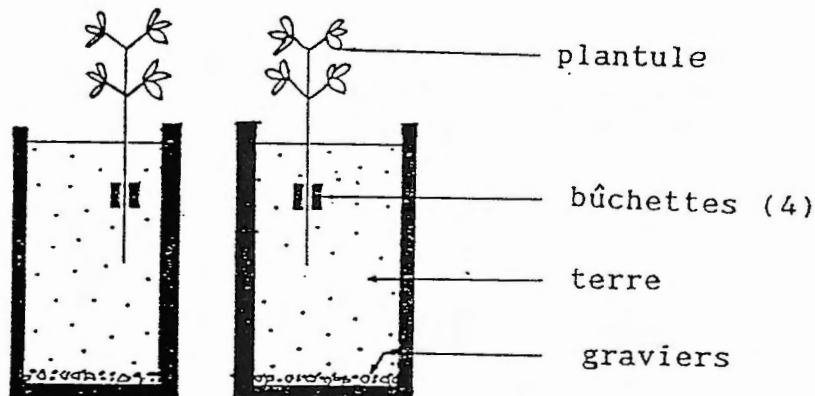


- 30 à 60 bûchettes + 100ml d'eau
- ↓
- autoclavage 1 heure, 120°C

- Ensemencement de 8 implants et incubation jusqu'au 1 février, à l'obscurité et à 26°C.

- Bûchettes infectées prêtes pour l'inoculation.

2. Inoculation plantules

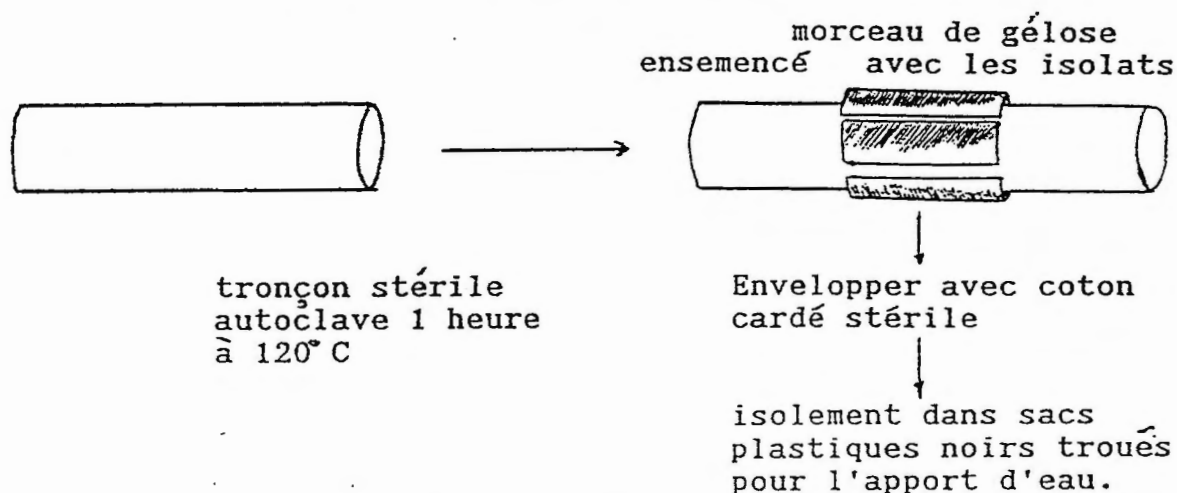


- . 1 isolât : [10 x 4] plantules.
- . 6 isolats : [10 x 4] x 6 = 240 plantules.
- . témoin 1 : plantules + bûchettes non infectées.
[10 x 4] = 40 plantules.
- . témoin 2 : plantules sans bûchettes
[10 x 4] = 40 plantules.
- . total plantules : 320
- . total sacs : 320
- . total bûchettes : 1120

figure 2 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL 2
Tronçons/ Plantules en bacs.

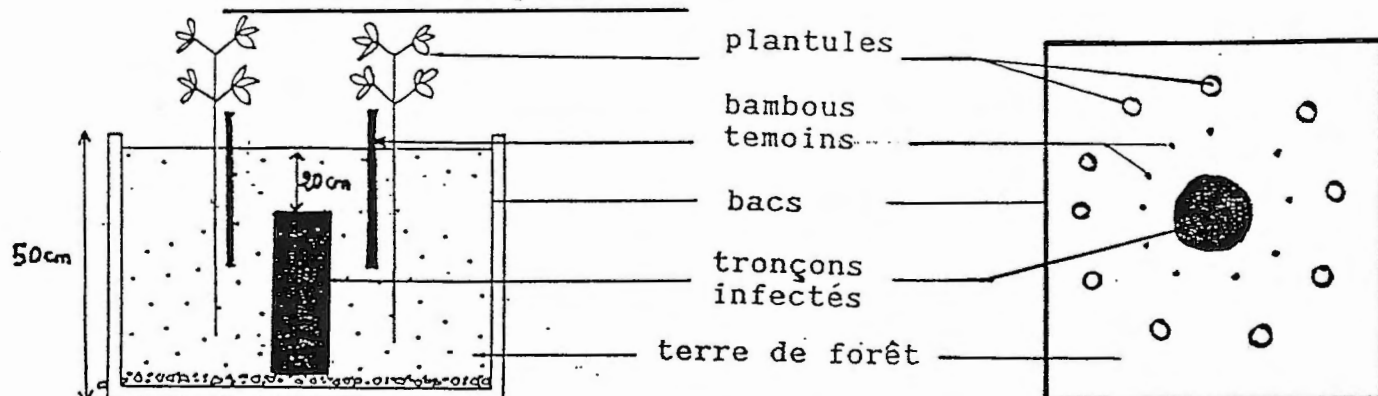
1. Infection des tronçons

tronçon : L = 30 cm d = 10 cm



- Le 1^{er} février: tronçons infectés prêts à être inoculés.

2. Inoculation plantules



1 isolat : [10 x 4] plantules = 40 plantules + 4 bacs.

6 isolats : 240 plantules + 24 bacs.

temoin 1 : plantules + tronçons non inoculés
40 plantules + 4 bacs

temoin 2 : plantules seuls
40 plantules + 4 bacs.

total plantules : 320

total bacs : 32

total tronçons : 35 (à cause du risque de contaminations).